



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07308195 A**(43) Date of publication of application: **28 . 11 . 95**

(51) Int. Cl.

**C12P 13/04****C12N 9/88****/(C12N 9/88 , C12R 1:19 ), (C12N 9/88 , C12R 1:13 )**(21) Application number: **06102789**(22) Date of filing: **17 . 05 . 94**(71) Applicant: **NIPPON SHOKUBAI CO LTD**(72) Inventor: **HAYASHI TAKAYA  
MUKOYAMA MASAHARU  
SAKANO KOICHI****(54) PRODUCTION OF L-ASPARTIC ACID****(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To efficiently obtain the subject amino acid without preparing a by- product unfavorable in terms of environment, by treating a substrate medium containing fumaric acid, ammonia and an alkali metal ion with an aspartase- containing substance, adding a mineral acid and recovering crystal.

**CONSTITUTION:** Fumaric acid, ammonia and an alkali metal ion (e.g. potassium phosphate) in an amount of 0.5-1.5mol based on 1mol of fumaric acid are dissolved in water to give a substrate medium, which is treated

with a cell of a microorganism having enzyme activity, a ground material of the cell, a partially purified enzyme or a purified enzyme or an immobilized substance containing it as an enzyme-containing substance having aspartase activity to form L-aspartic acid. A mineral acid is added to the reacted medium containing L-aspartic acid, formed crystal of L-aspartic acid is filtered, recovered and waste liquor consisting essentially of an alkali metal salt of the mineral acid is discharged to efficiently give the objective L-aspartic acid without discharging a large amount of an ammonium salt unfavorable in terms of environment.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-308195

(43) 公開日 平成7年(1995)11月28日

| (51) Int.Cl. <sup>6</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|------|---------|-----|--------|
| C 1 2 P 13/04             |      | 2121-4B |     |        |
| C 1 2 N 9/88              |      |         |     |        |
| // (C 1 2 N 9/88          |      |         |     |        |
| C 1 2 R 1:19)             |      |         |     |        |
| (C 1 2 N 9/88             |      |         |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 4 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-102789

(71) 出願人 000004628

株式会社日本触媒

(22) 出願日 平成6年(1994)5月17日

大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

(72) 発明者 林 隆哉

茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒筑波研究所内

(72) 発明者 向山 正治

茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒筑波研究所内

(72) 発明者 阪野 公一

茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒筑波研究所内

(54) 【発明の名称】 L-アスパラギン酸の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 フマル酸とアンモニアからL-アスパラギン酸を生産する際、多量のアンモニウム塩を排出しないL-アスパラギン酸の製造方法を提供する。

【構成】 フマル酸とアンモニアおよびアルカリ金属イオンを含む基質媒体に、アスパルターゼ活性を有する酵素含有物を作用せしめることによりL-アスパラギン酸を生成せしめ、次にL-アスパラギン酸を含有する反応済媒体に鉍酸を加え、析出したL-アスパラギン酸の結晶を濾別・回収すると共に、鉍酸のアルカリ金属塩を主成分とする廃液を排出するL-アスパラギン酸の製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 フマル酸とアンモニアおよびアルカリ金属イオンを含む基質媒体に、アスパルターゼ活性を有する酵素含有物を作用せしめることによりL-アスパラギン酸を生成せしめ、次にL-アスパラギン酸を含有する反応済媒体に鉍酸を加え、L-アスパラギン酸の結晶を濾別・回収すると共に、鉍酸のアルカリ金属塩を主成分とする廃液を排出することを特徴とするL-アスパラギン酸の製造方法。

【請求項2】 アスパルターゼ活性を有する酵素含有物が、酵素活性を有する微生物菌体、菌体破砕物、部分精製酵素もしくは精製酵素、またはこれらを含んでなる固定化物である請求項1記載の方法。

【請求項3】 フマル酸に対して0.5～1.5倍モルのアルカリ金属イオンを含む請求項1～2のいずれかに記載の方法。

【請求項4】 アルカリ金属イオンがナトリウムイオンおよび/またはカリウムイオンである請求項1～3のいずれかに記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はフマル酸とアンモニアからL-アスパラギン酸を生産する際、多量のアンモニウムイオンを含んだ廃水を排出しないようにする方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、アスパルターゼ活性を有する微生物を用いてフマル酸アンモニウムからL-アスパラギン酸を製造する方法としては、 $\alpha$ -アミノ酪酸に耐性を有する微生物を好氣的に培養後反応に供する方法（特公昭61-29718号公報）、フマル酸添加培地で培養した微生物菌体を用いる方法（特開昭60-120983号公報）、天然物多糖由来のポリマー等に大腸菌(*Escherichia coli*)を固定化した固定化微生物充填カラムを用いる方法（特開昭53-6483号公報）など種々の方法が知られている。

【0003】 通常、フマル酸とアンモニアの反応液からL-アスパラギン酸を回収するためには、硫酸などの鉍酸を用いて、反応液のpHをL-アスパラギン酸の等電点であるpH2.7程度に調節後、冷却することによってL-アスパラギン酸の結晶を析出させ、これを濾別する方法がとられている。

【0004】 この方法は安価な鉍酸を用いること、生産物であるL-アスパラギン酸の結晶としての回収率が高いこと、得られるL-アスパラギン酸の純度が高いことから非常に経済的に有利な方法である。

【0005】 しかしながら、産業廃棄物という観点からは、高濃度の硫酸アンモニウム等のアンモニウム塩を含有した廃水が大量に排出されるという問題点を有している。水溶液中のアンモニウムイオンの除去は廃水処理の

面でも非常に困難であり、湖沼や瀬戸内海などの内湾ではアンモニウムイオンを含む窒素濃度が上昇することによる水質汚染などの問題が生じてきている。また最近、工場廃水中の窒素濃度の規制についても各省庁で検討が行われているようである。従って、L-アスパラギン酸の製造においても硫酸などの副生成物が多量に発生しない系の開発が望まれている。

【0006】 米国特許4560653ではL-アスパラギン酸の生産の際にアスパルターゼもしくはアスパルターゼ生産菌をフマル酸とアンモニアに作用させ、生成したアスパラギン酸アンモニウム水溶液にマレイン酸を添加して酸性にすることによってL-アスパラギン酸を析出させ、濾液を異性化することによって反応液のリサイクルを行う方法が提案されている。この方法は、硫酸などの副生成物が発生しない方法である。しかしこの方法ではL-アスパラギン酸の析出に用いたマレイン酸を、臭素イオンを含んだ触媒を用いて、アスパルターゼが作用できるフマル酸に異性化し、異性化後、触媒を除去する工程が含まれており、L-アスパラギン酸の製造工程が煩雑になる欠点を有している。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的はフマル酸とアンモニアからL-アスパラギン酸を生産する際、多量のアンモニウム塩を排出しない、L-アスパラギン酸の製造方法を提供しようとするものである。

【0008】 本発明者らはこのような高濃度のアンモニウムイオンを含有した廃水が大量に排出されない、簡易なL-アスパラギン酸の製造方法について鋭意検討を行った結果、この反応の基質であるフマル酸を中和するのに従来用いられていたアンモニア単独の条件にかえてアルカリ金属イオンをあわせて用いると反応の転化率、選択率共に通常工業的に行われている方法と遜色ない結果が得られることを見だし本発明を完成させるに至った。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本発明はフマル酸とアンモニアおよびアルカリ金属イオンを含む基質媒体に、アスパルターゼ活性を有する酵素含有物を作用せしめることによりL-アスパラギン酸を生成せしめ、次にL-アスパラギン酸を含有する反応済媒体に鉍酸を加え、析出したL-アスパラギン酸の結晶を濾別・回収すると共に、鉍酸のアルカリ金属塩を主成分とする廃液を排出することを特徴とするL-アスパラギン酸の製造方法に関するものである。

【0010】 本発明に用いるフマル酸はフマル酸あるいはフマル酸塩から選ばれるものであって、これらの混合物でもよい。反応の際のフマル酸濃度は通常5～30重量%が好ましいがフマル酸塩の溶解度と生産性の面から特に10～25重量%が好ましい。

【0011】 本発明に用いられるアンモニアは液体アン

モニア、アンモニア水溶液等が使用可能であるが、取扱上、アンモニア水溶液が有利である。

【0012】アンモニア水の濃度としては特に限定されるものではないが、工業的には10～35重量%が利用するのに好ましい。

【0013】本発明に用いられるフマル酸を中和するにあたって使用するアルカリ金属イオンの量はフマル酸に対して0.5～1.5倍モル、好ましくは0.9～1.3倍モル、より好ましくは1.10～1.25倍モル用いるのがよい。

【0014】本発明に用いるアルカリ金属イオンとしてはナトリウムイオン、カリウムイオンのほか各種のアルカリ金属イオンが使用できるが、経済的には水酸化ナトリウムか水酸化カリウムをアルカリ金属イオンとして用いるのが好ましい。またこれらのアルカリ金属水酸化物は2種以上のものを混合して用いても差し支えない。さらにフマル酸をアルカリ金属イオンで中和するかわりにフマル酸のアルカリ金属塩をそのまま用いても差し支えない。

【0015】反応液のpHは5から10の範囲、好ましくは7.5から9.0の範囲、さらに好ましくはアスパルターゼの至適pHである8.0～8.5程度にアルカリ金属イオンおよびアンモニアを添加して調整すればよい。

【0016】本発明に用いるアスパルターゼ活性を有する酵素含有物は、アスパルターゼが高活性な微生物菌体そのもの、あるいは超音波、摩砕、凍結融解、酵素処理、界面活性剤処理などにより物理的または生化学的に処理して破砕した菌体破砕物、さらに硫酸アンモニウム塩析、アセトン沈殿等常法により得られる酵素のいずれでも使用できる。アスパルターゼ活性を有する微生物としては、例えばエッシャーシア(Escherichia)属に属する微生物(エッシャーシア・コリ(Escherichia coli) ATCC11303、ATCC9637、ATCC27325)、ブレバクテリウム(Brevibacterium)属に属する微生物などフマル酸よりL-アスパラギン酸を収率よく生成する特徴を有する微生物であれば特に限定されない。これらのアスパルターゼ活性を有する酵素含有物を担体に固定化して用いることもできる。固定化の担体としては、セルロース、アルギン酸、カラギーナ、ナンマンゲルなどの適当な天然系高分子、あるいはイオン交換樹脂やポリビニルアルコール、ポリアクリルアミドなどの適当な合成高分子などを常法により用いることができる。

【0017】また、反応に用いるアスパルターゼ活性を有する酵素含有物中に含まれるフマラーゼ活性など該反応の妨げになりうるアスパルターゼ活性以外の酵素を予め失活させたものを反応に用いることも可能である。たとえば酵素含有物を、予め、L-アスパラギン酸およびアンモニウムイオン存在下、アルカリ域で40～60℃

に加熱処理を行い、フマラーゼ活性を予め失活させておくこともできる。

【0018】フマル酸とアンモニアとの反応はそれらを溶解した水性媒体、たとえば水または緩衝液中で行う。反応の際の原料のフマル酸の濃度は5～30重量%好ましいが、フマル酸塩の溶解性と生体触媒の反応性を考えると特に10～25重量%の範囲の水溶液で反応させるのが効果的である。

【0019】また反応液にはさらに塩化マンガン、硫酸マンガンなどのマンガン塩、または塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムなどのマグネシウム塩を0.1～50mM、特に1～10mMの濃度で添加することが好ましい。

【0020】本発明における反応槽の態様は特に限定されないが、例えば、バッチ型反応装置、カラム型反応装置など従来から知られている反応槽で反応を行うことができる。反応槽は1つであってもよいし、複数あっても差し支えない。またカラム型の反応装置の場合には、通液速度をカラムに充填されている酵素の量によって変えて反応することも可能である。

【0021】反応の際の温度は低温では反応速度が低下するため通常20℃程度を下限とし、高温下ではアスパルターゼの失活を招くため50℃程度を上限とするのが好ましく、より好ましくは25～40℃の範囲で行うのがよい。

【0022】反応後の液中のL-アスパラギン酸は常法通り等電点沈殿法等により容易に回収できる。例えば反応液に硫酸等の鉱酸を添加しpHをL-アスパラギン酸の等電点である2.77程度に低下させ、冷却することによって結晶を析出させればよい。

【0023】本発明に用いる鉱酸としては硫酸、塩酸、リン酸などが使用できる。

【0024】析出したL-アスパラギン酸の結晶は通常の方法、例えば濾過、遠心分離、デカンテーションなどの方法で液から分離し、通常の方法にしたがって乾燥される。斯くして結晶を分離した液中のアンモニウムイオンの濃度は通常の工業的に実施されている方法に比べて数分の一から数十分の一となっており、主成分は鉱酸のアルカリ金属塩である。

【0025】

【作用】本発明によれば、フマル酸とアンモニアからL-アスパラギン酸の製造に際して、廃水の主成分を従来の硫酸アンモニウムから硫酸のアルカリ金属塩にかえることができ、近年の工業廃水に対する空素規制に対応することができる。

【0026】

【実施例】次に本発明の方法を実施例をあげて説明するが、本発明はかかる実施例のみに限定されるものではない。

【0027】実施例1

2 L ジャーファーマンターにフマル酸 20 g、リン酸 1 カリウム 1 g、硫酸マグネシウム 7 水塩 0.5 g、酵母 エキス 20 g、コーンステープリカー 20 g を水に溶解し、pH をアンモニアで 6.8 に調節した培地 1 L を仕込み滅菌した後、別に 500 ml 振盪フラスコに同様の培地 500 ml をいれて培養しておいたエッシャーヒア コリ (*Escherichia coli* ATCC 11303) を接種し、37 °C で通気攪拌培養した。培地中のフマル酸が消失した時点で、菌体培養液に酢酸を加え、pH を約 5 に調整し、45 °C で 1 時間放置した後、培養液を遠心分離にかけ、菌体を分離した。この菌体を 3 等分し、-80 °C で凍結して冷蔵した。

【0028】フマル酸 200 g および硫酸マグネシウム 7 水塩 0.25 g を水 600 ml にいれ、水酸化ナトリウムを 82.8 g (対フマル酸 1.2 倍モル) 添加後、25% アンモニア水を用いて pH を 8.3 に調節し、水を追加して 1 L とし、これを反応基質溶液とした。

【0029】この基質液に先に 3 等分した凍結菌体の一つを入れ、37 °C で緩やかに振盪しながら 5 時間反応させた。この反応液中の L-アスパラギン酸は 221.3 g であった。この反応液を遠心分離して菌体を除いた後、硫酸を添加し、pH を 2.77 に調節した。これを 60 °C に加熱、その後冷却した。冷却後、吸引濾過器で吸引濾過し、濾過器内の結晶を約 150 ml の水で吸引しながら洗浄し、この結晶を乾燥し重量、純度を調べたところ、重量 216.4 g、純度 99.6% の L-アスパラギン酸を得た。濾液 1 L 中のアンモニア濃度を測定したところ、NH<sub>3</sub> として約 1.0 g/L であった。

#### 【0030】実施例 2

実施例 1 において、反応基質に加える水酸化ナトリウムの量を 100 g (対フマル酸 1.45 倍モル) とした以

外は実施例 1 と同様な操作を行った。反応後の反応液中の L-アスパラギン酸は 178.1 g であった。実施例 1 と同様な方法で L-アスパラギン酸の晶析を行い、重量 219 g、純度 80% の L-アスパラギン酸を得た。濾液中のアンモニア濃度を測定したところ、NH<sub>3</sub> として約 0.85 g/L であった。

#### 【0031】実施例 3

実施例 1 において、反応基質に水酸化ナトリウムを水酸化カリウムにし、これを 96.7 g (対フマル酸 1.0 倍モル) 添加する以外は実施例 1 と同様な反応を行った。反応後の反応液中の L-アスパラギン酸は 225.9 g であった。実施例 1 と同様な方法で L-アスパラギン酸の晶析を行い、重量 222.0 g、純度 99.4% の L-アスパラギン酸を得た。濾液中のアンモニア濃度を測定したところ、NH<sub>3</sub> として約 5.7 g/L であった。

#### 【0032】比較例 1

実施例 1 において、反応基質に水酸化ナトリウムを添加せずに 25% アンモニア水を加え、pH を 8.3 に調節した以外は実施例 1 と同様の操作を行なった。反応後の反応液中の L-アスパラギン酸は 227.3 g であった。この反応液を実施例 1 と同様な方法で処理し結晶と母液を得た。結晶を乾燥し重量、純度を調べたところ、重量 223.3 g、純度 99.6% の L-アスパラギン酸を得た。濾液中のアンモニア濃度を測定したところ、NH<sub>3</sub> として約 35.2 g/L であった。

#### 【0033】

【発明の効果】本発明によれば、高濃度の硫酸アンモニア水溶液などの環境上好ましくない副生成物を伴わずに L-アスパラギン酸を効率よくフマル酸を原料に製造することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>3</sup>

C 12 R 1:13)

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所